

蛇床子超临界提取物的皮肤毒理学研究

王永辉^{1,2*}, 周 然¹, 李艳彦¹, 张 荣¹

(1. 山西中医学院, 山西 太原 030024; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的: 评价蛇床子超临界提取物皮肤局部用药的安全性。方法: 皮肤急性毒性试验: 蛇床子超临界提取物按 $3.75 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$, $30 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的剂量分别涂于豚鼠完整皮肤、破损皮肤, 给药 1 次, 观察蛇床子超临界提取物对皮肤的急性毒性反应; 多次皮肤刺激性试验: 蛇床子超临界提取物按 $3.75 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的剂量分别涂于豚鼠完整皮肤、破损皮肤, 每日 1 次, 连续给药 7 d, 观察蛇床子超临界提取物的皮肤刺激性; 皮肤过敏试验: 以 $3.75 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 蛇床子超临界提取物反复接触豚鼠皮肤致敏, 末次致敏 14 d 后予以激发, 观察蛇床子超临界提取物有无致敏作用; 皮肤光敏试验: 用医用紫外灯照射白兔涂药区皮肤, 以观察蛇床子超临界提取物有无皮肤光毒性。结果: 蛇床子超临界提取物 $30 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 剂量无急性皮肤毒性, $3.75 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 剂量无皮肤刺激性, $3.33 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 剂量无致敏作用; 但 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 剂量有一定的皮肤光毒性。结论: 蛇床子超临界提取物外用无明显急性皮肤毒性, 无明显皮肤刺激性和致敏作用, 但有一定皮肤光毒性。

[关键词] 蛇床子; 超临界提取物; 皮肤毒理学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)12-0038-04

蛇床子为伞形科蛇床属植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cusson 的干燥成熟果实, 具有温肾助阳, 祛风燥湿, 杀虫止痒之功; 有抗阴道滴虫、真菌、病毒, 驱蛔虫, 类似性激素样作用^[1]; 解痉, 祛痰和抗过敏作用^[2]。临床上多外用治疗阴道滴虫、外阴湿疹、皮肤瘙痒、疥癣湿疮等症。古今均以蛇床子煎水熏洗治疗瘙痒症, 疗效显著。在许多治疗瘙痒症的外用复方中, 蛇床子亦为主药^[3]。经系统研究发现蛇床子超临界提取物局部外用有明显的止痒效果^[4], 本试验旨在考察蛇床子超临界提取物局部外用的安全性, 现将结果报道如下。

1 材料

1.1 药品与试剂 蛇床子: 为伞形科蛇床属植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cusson 的干燥成熟果实, 取自山西省中医药研究院草药房。蛇床子超临界提取物(SFE)为中国科学院煤炭化学研究院超临界萃取所得(萃取工艺: 蛇床子药材粉碎, 过 40 目筛; 萃取压力为 25 MPa, 萃取温度为 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$, CO_2 流量为 $70 \text{ kg} \cdot \text{h}^{-1}$; 解析釜压力为 6 MPa, 温度: $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 萃取时间: 1

h。得率: 9%; 其提取物中按蛇床子素计不低于 $200 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$); 临用时加入适量以赋形剂[羊毛脂: 凡士林(5: 95)]制成 7.5%、60% 的蛇床子超临界提取物软膏。2, 4-二硝基氯苯(AR), 北京化工厂, 批号: 710710; 其它试剂均为市售分析纯。

1.2 动物 英国短毛种白色豚鼠, 体重(290 ± 30) g, ♀ ♂各半, 由山西省中医药研究院动物室提供, 清洁级, 合格证号: 晋动(证)号第 A00-004 号。大耳白家兔, 体重 2~3 kg, ♀ ♂各半, 由山西省中医药研究院动物室提供, 普通级。

1.3 仪器 HA121-50-02 超临界萃取仪, 南通市华安超临界有限公司。UV-紫外灯, 美国 Spectronics 公司。

2 方法

2.1 豚鼠皮肤单次涂药的急性毒性试验^[5]

2.1.1 备皮 取适应环境后的豚鼠 50 只, ♀ ♂各半, 体重(290 ± 30) g, 于给药前 24 h, 将豚鼠背部脊柱两侧仔细剔除毛发, 范围约 40 cm^2 ($8 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$), 约占体表面积的 10%, 小心操作, 勿损伤豚鼠皮肤, 去毛后 24 h 检查去毛区域皮肤有无破损, 若皮肤有破损则不能用于完整皮肤组。

2.1.2 分组与给药 将符合标准的豚鼠随机分为 5 组, 每组 10 只, ♀ ♂各半。即: ①空白对照组: 涂等量赋形剂; ②完整皮肤低剂量组, 涂 7.5% 蛇床子超

[收稿日期] 2007-05-18

[基金项目] 山西省科技厅攻关项目(011039)

[通讯作者] * 王永辉, Tel: 13068048517; E-mail: wyh766188@sina.com。

临界提取物 $2\text{ g}(3.75\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2})$; ③完整皮肤高剂量组,涂 60% 蛇床子超临界提取物 $2\text{ g}(30\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2})$; ④破损皮肤低剂量组,涂 7.5% 蛇床子超临界提取物 $2\text{ g}(3.75\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2})$; ⑤破损皮肤高剂量组,涂 60% 蛇床子超临界提取物 $2\text{ g}(30\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2})$ 。破损皮肤组动物给药前将给药部位皮肤消毒后,以消毒针头在皮肤上划“#”形,以损伤表皮,不伤真皮,皮肤轻度渗血为度。各组豚鼠在去毛区皮肤上均匀涂布相应药物,以无刺激性纱布胶布固定,保留 24 h。每只动物分笼饲养。

2.1.3 一般状况及毒性反应观察 给予蛇床子超临界提取物软膏 24 h 后,用无刺激性洗涤剂将残留药物清洗干净,于去除受试物后 1 h, 24 h, 48 h, 72 h 至第 7 d 逐日观察并记录动物体重,皮肤毛发、眼、黏膜的变化,观察呼吸、自主活动、行为改变、中枢神经系统等变化。

2.2 豚鼠皮肤多次涂药的刺激性试验^[5]

2.2.1 备皮 取适应环境后的豚鼠 12 只,♀ ♂各半,体重(290±30)g,按 2.1.1 方法备皮。

2.2.2 分组与给药 将符合标准豚鼠随机分为两组,每组 6 只,♀ ♂各半。即:①完好皮肤组;②破损皮肤组:破损皮肤组豚鼠于给药前以消毒针头在去毛区消毒皮肤上划出“#”形擦痕,以刺伤表皮,不伤真皮,皮肤轻度渗血为度,且保持脊柱两侧破损程度基本一致。本试验采用同体左右侧自身对比的方法,两组动物脊柱左侧脱毛区皮肤均涂以受试药物 7.5% 蛇床子超临界提取物 $2\text{ g}(3.75\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2})$,右侧涂以等量赋形剂作为对照,用无刺激性纱布胶带固定。每只动物分笼饲养,每日涂药 1 次,保持 6 h,连续 7 d。

2.2.3 皮肤刺激性反应观察及皮肤刺激性强度评价 于末次给药 24 h 后,用无刺激性洗涤剂洗去残留药物及赋形剂,在去除残留药物后 1 h,以肉眼观察药物涂抹部位皮肤有无红斑、水肿等情况,以后每隔 24 h 观察 1 次,连续 7 d。按表 1^[5] 进行评分、记录;并按表 2^[5] 评价受试药物的皮肤刺激性。

2.3 豚鼠皮肤过敏试验^[5]

2.3.1 备皮 取适应环境后的豚鼠 36 只,♀ ♂各半,体重(290±30)g,于给药前 24 h,将豚鼠背部脊柱两侧仔细剔除毛发,两侧去毛区域面积各为(3×3)cm,小心操作,勿损伤豚鼠皮肤,去毛后 24 h 检查去毛区域皮肤有无破损,若有则弃之不用。

2.3.2 分组与给药 将合格动物随机分为 3 组,每组 10 只,♀ ♂各半。即:①受试药物组:给予 7.5% 蛇床子超临界提取物(3.33 $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$);②阳性对照组:给予 1% 2,4-二硝基氯苯;③空白对照组:给予等量赋形剂。

表 1 皮肤刺激性反应评分标准

皮肤刺激性反应情况	分值
红斑:无红斑	0
勉强可见	1
明显可见	2
中度到严重红斑	3
紫红色红斑并有焦痂形成	4
水肿:无水肿	0
勉强可见	1
可见(边缘高出皮肤)	2
皮肤隆起约 1 mm,轮廓清楚	3
水肿隆起 1 mm 以上并范围扩大	4
最高总分值	8

表 2 皮肤刺激性强度评价标准

平均分	评价标准
0~ 0.49	无刺激性
0.5~ 2.99	轻度刺激性
3.0~ 5.99	中度刺激性
6.0~ 8.00	强度刺激性

2.3.3 致敏接触 以皮肤涂抹法给药,受试药物组以 7.5% 蛇床子超临界提取物 0.4 g 均匀涂在豚鼠左侧脱毛区,用一层油纸及二层纱布覆盖,再以无刺激性胶布封闭固定,持续 6 h,每只动物分笼饲养;于首次致敏给药后第 7 d、第 14 d 以同样方法各重复 1 次,共计 3 次。空白对照组与阳性对照组同法操作给予相应药物。

2.3.4 激发接触 于末次给予受试药致敏后第 14 d,将 0.4 g 蛇床子超临界提取物均匀涂于豚鼠背部右侧脱毛区,空白对照组涂以等量赋形剂,阳性对照组涂以 0.2 mL 0.1% 2,4-二硝基氯苯,用一层油纸及二层纱布覆盖,再以无刺激性胶布封闭固定,持续 6 h,每只动物分笼饲养。

2.3.5 过敏反应观察及过敏反应强度评价 激敏给药 6 h 后以无刺激性洗涤剂洗去残留药物,于 0, 24, 48, 72 h 分别观察各组动物皮肤过敏反应性状。按表 3^[5] 记录各时间点过敏反应分值;按表 4^[5] 评价各组药物致敏性。将出现皮肤红斑、水肿、全身过敏

反应的动物例数(无论程度轻重)除以受试动物总数,即为致敏发生率。

表 3 皮肤过敏反应程度的评分标准

皮肤过敏反应情况	分值
红斑: 无红斑	0
轻度红斑	1
中度红斑	2
重度红斑	3
紫红色红斑并有焦痂形成	4
水肿: 无水肿	0
轻度水肿, 勉强可见	1
中度水肿, 明显可见	2
重度水肿, 皮肤隆起 1 mm, 轮廓清楚	3
严重水肿, 皮肤隆起 1 mm 以上, 并有扩大或水泡	4
最高总分值	8

表 4 皮肤致敏性评价标准

致敏发生率(%)	皮肤致敏性评价
0~ 10	无
11~ 30	轻度
31~ 60	中度
61~ 80	重度
81~ 100	极度

2.4 家兔皮肤光毒性试验

2.4.1 备皮 取适应环境后的白兔 8 只, ♀ ♂各半, 体重(2~ 3) kg, 将实验动物脊柱一侧剃毛, 去毛范围(4×8) cm, 小心操作, 勿损伤家兔皮肤, 去毛后 24 h 检查去毛区域皮肤有无破损, 若皮肤有破损则弃之不用。

2.4.2 皮肤光毒性试验 参照 GB7919-87 方法进行家兔皮肤光毒性试验, 用紫外灯照射去毛区皮肤(照射光源为 365 nm 的 UVA), 强度为 6 500 uw·cm⁻², 以观察确定照射后(8~ 12) h 引起一度红斑的照射时间

(MED), 测得 MED 值为 15 cm, 20 min。于预试验 3 天后, 以家兔脊柱为对称轴, 两侧各剃毛二块, 每块剃毛范围(2×2) cm。将 7.5% 蛇床子超临界提取物 0.4 g 均匀涂于白兔右侧 2 个脱毛区, 一个用黑纸遮盖以避免光照; 白兔左侧脱毛区均匀涂以等量赋形剂, 一个也用黑纸遮盖以避免光照。涂药 1 h 后, 用亚 MED(照射剂量为 15 cm, 15 min) 紫外线照射, 于照射后 1, 24, 48, 72 h 观察皮肤反应, 并按表 3^[5] 进行皮肤反应强度评分。

2.5 试验动物的皮肤反应数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 急性皮肤毒性 连续观察 7 d, 蛇床子超临界提取物在低剂量(3.75 mg·cm⁻²), 高剂量(30 mg·cm⁻²) 外用时对完整皮肤豚鼠和破损皮肤豚鼠的行为、活动、饮食、皮毛光泽、体重及眼、黏膜无明显影响; 试验过程中各组动物均无死亡。第 7 d 观察结束后, 进行杀检, 各组动物均未见肉眼可见的病变。

3.2 皮肤刺激性试验 去除受试药物 1 h 时正常皮肤组有 2 只豚鼠涂药侧皮肤有勉强可见的红斑, 于 24 h 后完全消退, 恢复正常; 赋形剂对照侧有 1 只动物有勉强可见的红斑, 于 24 h 完全消退, 恢复正常。破损皮肤组豚鼠涂药侧有 2 只豚鼠有勉强可见的红斑, 其中 1 只于 48 h 后完全消退, 另 1 只于 72 h 后完全消退; 赋形剂组涂药侧有 1 只动物有勉强可见的红斑, 于 48 h 完全消退, 恢复正常。在试验过程中未观察到动物涂药部位皮肤有水肿、色素沉着、出血、皮肤粗糙或皮肤菲薄现象。蛇床子超临界提取物在各时段对豚鼠皮肤刺激的平均反应值均小于 < 0.49, 故可认定蛇床子超临界提取物对豚鼠正常皮肤和破损皮肤均无刺激性。蛇床子超临界提取物皮肤刺激平均反应分值见表 5。

表 5 蛇床子超临界提取物对皮肤刺激的平均反应分值(n= 6)

分组	剂量 (mg·cm ⁻²)	平均分				
		1 h	24 h	48 h	72 h	
正常皮肤组	SFE 软膏	3.75	0.333 ± 0.516	0	0	0
	赋形剂	—	0.167 ± 0.408	0	0	0
破损皮肤组	SFE 软膏	3.75	0.333 ± 0.516	0.333 ± 0.516	0.167 ± 0.408	0
	赋形剂	—	0.167 ± 0.408	0.167 ± 0.408	0	0

3.3 皮肤过敏反应试验 阳性药物 2, 4-二硝基氯苯组动物皮肤受试区自激发给药 6 h 后, 有 6 只动物

现轻度红斑, 4 只动物现中度红斑; 10 只动物均无水肿现象, 致敏率为 100%。蛇床子超临界提取物组、

赋形剂组均无红斑、水肿等现象出现, 试验过程中未发现豚鼠出现哮喘、站立不稳、休克等全身性过敏反应现象, 致敏率为 0%, 故可认定蛇床子超临界提取物无致敏作用。各组药物致敏性评价见表 6。

3.4 皮肤光毒性试验 受试家兔涂药区域皮肤接受紫外灯照射 24 h 后, 所有动物受试区皮肤均出现

中度以上红斑, 并于 72 h 观察结束时无消退迹象, 但均未见到有水肿现象, 平均皮肤反应强度 ≥ 2 级; 遮光区域皮肤及涂布赋形剂的局部皮肤均未见阳性结果, 可以判定蛇床子超临界提取物具有一定程度的光毒性。蛇床子超临界提取物皮肤光毒性试验平均反应分值见表 7。

表 6 蛇床子超临界提取物对皮肤过敏反应分值表 (n = 10)

分组	剂量 (mg·cm ⁻²)	平均分				致敏率 (%)
		6 h	24 h	48 h	72 h	
SFE 软膏	3.33	0	0	0	0	0
2,4-二硝基氯苯组	0.02	1.4 ± 0.516	1.7 ± 0.483 0	1.9 ± 0.876 0	1.9 ± 1.197 0	100
空白对照组	—	0	0	0	0	0

表 7 蛇床子超临界提取物皮肤光毒性试验平均反应分值 (n = 8)

分组	剂量 (mg·cm ⁻²)	平均分			
		1 h	24 h	48 h	72 h
SFE 软膏+光照	7.50	0.75 ± 0.463	2.5 ± 0.926	3.25 ± 0.707	3.5 ± 0.756
赋形剂+光照	—	0	0	0	0
SFE 软膏+遮光	7.50	0	0	0	0
赋形剂+遮光	—	0	0	0	0

4 讨论

药物的光毒性反应是指在用药后, 机体暴露于阳光中, 皮肤对光线产生的一种不良反应, 其产生机制是由于存在于局部皮肤的光敏物质受到日光照射后, 因光动力作用而发生能量传递, 产生光化学反应, 光敏物质吸收的紫外光能量在皮肤中释放, 从而导致局部皮肤的损伤。光毒性反应与光变态反应不同, 它是一种非免疫性反应, 凡实验动物第一次与受试物接触, 并在光能作用下引起类似晒斑的局部皮肤炎症反应, 即可认为该受试物具有光毒作用。任何个体只要存在某种光敏物, 再经过适当波长(UVA 或 UVB) 和时间的照射后即可发生反应。光毒性反应的产生时间通常较短, 一般在光照 24 h 左右或更短时间内即可发生, 皮肤暴露部位呈日晒斑或日光性皮炎症状: 刺痛感、红斑、水肿甚至水疱、大疱, 继之脱屑、色素沉着, 甚至可发展到非照射部位。其所导致的皮肤病变一般病程较短, 消退快, 病变主要在表皮。^[6]

本文的各项皮肤毒理学研究结果表明, 蛇床子超临界提取物对豚鼠无明显急性皮肤毒性作用; 对

豚鼠完整皮肤和破损皮肤无明显刺激性作用; 对豚鼠无明显致敏作用; 但皮肤光毒性试验结果表明蛇床子超临界提取物具有一定的光毒性, 在涂药后局部皮肤应注意避免光照, 以免引发光敏性皮炎等不良反应, 其具体机制尚需进行进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 刘寿山. 中药研究文献摘要[M]. 北京: 科学出版社, 1963. 672.
- [2] 陈志春, 王凤翔, 姜红, 等. 蛇床子总香豆素的药理研究[J]. 中药通报, 1986, 11(2): 50.
- [3] 郑虎占. 中药现代研究与应用第五卷[M]. 北京: 学苑出版社, 1998. 4140.
- [4] 李艳彦, 周然, 冯玛莉, 等. 蛇床子超临界萃取物止痒作用及拮抗组胺释放作用的实验研究[J]. 中国药物与临床, 2003, 3(4): 316.
- [5] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 229-238.
- [6] 刘初阳. 药物的不良反应——光敏反应及其防治[J]. 广东药学, 2005, 15(5): 45.